

NUCLEOTIDE PROBES AND METHOD FOR DETERMINING HLA DQB1 TYPING

Publication number: JP2000511430 (T)

Publication date: 2000-09-05

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:


- international: **C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68;** (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68


- European: C12Q1/68M4


Application number: JP19980500276T 19970603


Priority number(s): WO1997FR00980 19970603; FR19960006822 19960603

Also published as:

 WO9746700 (A1)

 FR2749308 (A1)

 EP0910667 (A1)

 CA2257182 (A1)

Abstract not available for JP 2000511430 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9746700 (A1)**

Nucleotide probe selected in particular among the following: TG CGT TAT GTG ACC AGA, GTG CGT CTT GTG ACC AGA, GT CTT GTA ACC AGA CAC AT, CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT, CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT, CG ACC GAG CTC GTG CGG CGT G, G TAC CGG GCA GTG ACG C, G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G, G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G, G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T, G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T, TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C, GG ACG GAG CGC GTG CG, C ATC TAT AAC CGA GA, and their complementary sequences, being understood that the said probes have at least the underlined sequence, and can further contain one or two bases selected, respecting the sequence continuity, among the non-underlined bases. These probes are useful for determining a person's HLA DQ beta genotype. They have in particular the advantage of being useable at a single hybridization temperature, in particular 37 DEG C.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-511430

(P2000-511430A)

(43) 公表日 平成12年9月5日(2000.9.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願平10-500276
(86) (22) 出願日 平成9年6月3日(1997.6.3)
(85) 翻訳文提出日 平成10年12月3日(1998.12.3)
(86) 国際出願番号 P C T / F R 9 7 / 0 0 9 8 0
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 6 7 0 0
(87) 国際公開日 平成9年12月11日(1997.12.11)
(31) 優先権主張番号 9 6 / 0 6 8 2 2
(32) 優先日 平成8年6月3日(1996.6.3)
(33) 優先権主張国 フランス (F R)
(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P, U S

(71) 出願人 ビオ メリウ
フランス国 69280 マルシールエトワ
ル (番地なし)
(72) 発明者 ムーガン, ブレーノ
フランス国 69008 リヨン, アベニュー
デ フレール リュミエール, 113
(74) 代理人 弁理士 松井 光夫

(54) 【発明の名称】 HLA DQB1 タイピングを決定するためのヌクレオチドプローブおよび方法

(57) 【要約】

特に下記配列TG CGT TAT GTG ACC
AGA, GT G CGT CTT GTG ACC
AGA, GT CTT GTA ACC AGA CA
C AT, CG T CTT GTA ACC AGA
TAC AT, CGT CTT GTG AGC A
GA AGC AT, CG ACC GAG CTC
GTG CGG CGT G, G TAC CGG G
CA GTG ACG C, G ACG CCG CT
G GGI CCG CCT G, G ACG CCG
CTG GGG CCG CCT G, G GAG
GGI ACC CIG GCI GAG T, G G
AG GGG ACC CGG GCG GAG T,
TCG GTG GAC ACC GTA TGC A
GA C, GG ACG GAG CGC GTG C
G, C ATC TAT AAC CGA GA, およ
びそれらの相補的配列から選択されるヌクレオチドプ
ローブであり、該プローブは、少なくとも下線部の配列を
有し、さらに、配列の連続性は妨げないで下線部以外の
塩基から選択される1または2個の塩基を含むことがで

きる。これらのプローブは、人のHLA DQベータ遺伝子型
の決定に有用である。それらは特に、単一のハイブリッ
ド形成温度、特に37℃で安定であるという利点を有す
る。

【特許請求の範囲】

1. 下記：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT ,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT ,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT ,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G ,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C ,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G ,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G ,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T ,
- G GAG GGG ACC CCG GCG GAG T ,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C ,
- GG ACG GAG CGC GTG CG ,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G ,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG ,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA ,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT ,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C ,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT ,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG ,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T ,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG ,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA ,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G ,

およびそれらの相補的配列から選択されるヌクレオチドプロープであって、該プロープが少なくとも下線部の配列を有し、さらに、その配列の連続性を保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでもよいヌクレオチドプロープ。

2. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACC GAG ITT GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

およびそれらの相補的配列によって定義されるものから選択される、請求項1に記載のプロープ。

3. 下記：

- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

およびそれらの相補的配列から選択される、請求項1に記載のプロープ。

4. 下記：

- G GGG IGL CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA.

から選択される、請求項1に記載のプローブ。

5. 下記：

- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGL GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

から選択される、請求項1に記載のプローブ。

6. 下記配列：

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

およびそれらの相補的配列によって定義されるものから選択される、請求項1に記載のプローブ。

7. 配列が下線部の配列およびそれらの相補的配列に対応する、請求項1～6のいずれか一つに記載のプローブ。

8. 該プローブが標識されているか、固体担体へのそれらの結合を容易にするためのリガンドにカップリングしているか、固体担体に結合していることを特徴とする、請求項1～7のいずれか一つに記載のプローブ。

9. サンプルに存在する標的核酸のHLA DQB1 タイピングを少なくとも部分的に決定する方法において、サンプル中の該核酸のオリゴヌクレオチドプローブとの公知方法によるハイブリッド形成の試験を行い、ハイブリッド形成が $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ に

等しい単一の温度で効果的に観察される試験を陽性の試験として選択し、該オリゴヌクレオチドプローブは請求項2で定義したものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブを含み、該プローブは少なくとも下線部の配列を含み、さらに、配列の連続性は保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでいてもよい方法。

10. 下記配列：

- **ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,**
- **GG CCT GTT GCC GAG TAC T,**
- **CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,**
- **CGG CCT GAT GCC GAG TAC,**

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブとサンプル中の核酸とのハイブリッド形成の試験をさらに行う、請求項9に記載の方法。

11. 下記配列：

- **GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,**
- **A GAG GAG GAC GTG CGC TT,**

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される少なくとも一つのプローブとサンプル中の標的核とのハイブリッド形成の試験をさらに行う、請求項9および10のいずれかに記載の方法。

12. 請求項3～5のいずれか一つで定義した少なくとも一つのプローブを使用する、請求項9～11のいずれか一つに記載の方法。

13. 該プローブを捕獲プローブとして使用する、請求項

9～12のいずれか一つに記載の方法。

14. 捕獲プローブとのハイブリッド形成により固体担体に結合された核酸の可

能性のある存在が、該捕獲プローブによって認識される以外の標的の領域とハイブリッド形成可能な標識された検出プローブによって示される、請求項13に記載の方法。

15. 検出プローブが、下記配列：

- **GG ACG GAG CGC GTG CG,**
- **C ATC TAT AAC CGA GA,**
- **CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.**

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される、請求項14に記載の方法。

16. 該プローブが請求項7と同様に定義されることを特徴とする、請求項9～15のいずれか一つに記載の方法。

17. 請求項1～6のいずれか一つで定義されるものから選択される少なくとも一つのプローブを含み、さらに、下記配列：

- **ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,**
- **GG CCT GTT GCC GAG TAC T,**
- **CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,**
- **CGG CCT GAT GCC GAG TAC,**
- **A GAG GAG GAC GTG CGC TT,**
- **GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,**
- **CGC TTC GAC AGC GAC GTG G,**

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される1以上のプローブを含み得る、HLA DQB1タイピング用キット。

18. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,

- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

によって定義されるプローブまたはそれらの相補的配列を含み、さらに、下記配列：

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

によって定義されるものまたはそれらの相補的配列から選択される1以上のプローブを含み得る、請求項17に記載のキット。

19. 下記配列：

- TG CGT TAT GTG ACC AGA,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGT CCG CCT G,
- G GAG GGT ACC CIG GCT GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

またはそれらの相補的配列によって定義されるプローブおよび所望により下記：

- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,

またはそれらの相補的配列を含む、請求項17に記載のキット。

20. 請求項3～5のいずれか一つに記載の少なくとも一つのプローブを含む、請求項17に記載のキット。

21. 請求項3および／または請求項4および／または請求項5で定義したプローブを含む、請求項20に記載のキット。

22. 該プローブが捕獲プローブとして使用できる、請求項17～21のいずれか一つに記載のキット。

23. さらに、下記：

- GG ACG GAG CGC GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

から選択される少なくとも一つの標識された検出プローブを含む、請求項18～

22のいずれか一つに記載のキット。

24. 該プローブが請求項7と同様に定義される、請求項17～23のいずれか一つに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

HLA DQB1タイピングを決定するための

ヌクレオチドプローブおよび方法

本発明の主題は、個々のHLA DQベータ (DQB) 遺伝子型を決定するための方法、プローブおよびキットである。

本発明の方法、プローブおよびキットは、特に、多型性HLA DQB1遺伝子の検出に関する。本発明のこの方法ならびにこれらのプローブおよびキットは、特に、移植におけるHLAタイピング、医療診断および法医学に適用できるが、HLA DQB1対立遺伝子の有無はインシュリン依存性糖尿病などの或る種の病気に対する感受性の指標としても役に立つと考えられる。

HLA (ヒトリンパ球抗原) 系は、ヒトの主要組織適合性複合体によってコードされる。それは、自己と非自己とを区別することにより、個人間の臓器移植の際の主な束縛となる。従って、HLA系の抗原は、臓器移植の際のドナーとレシピエントとの間の特徴および或る種の病気に対する個人の素質を決定するためのタイピング方法において使用されている。

遺伝的観点から、HLA系は十分解析され、第6染色体の短腕上に約2センチメートルの間隔で位置する、多かれ少なかれ多型性の一連の遺伝子座から成る。この系の3個の遺伝子座 (HLA-A、BおよびC) は、共優生的に発現され

る一群のアロ抗原 (クラスI) をコードする。別の領域 (HLA-D) は実際にいくつかの遺伝子を含み、高度の多型性で共優生的に発現される第二群のアロ抗原 (クラスII) をコードする。他の特に成分C2、C4を制御するいくつかの遺伝子座および相補カスケード因子BfもHLA系に属する (クラスIII)。臓器移植の成功は、かなりの部分が、レシピエントとドナーとの間のHLA同一性 (クラスIおよびII) に依存する。従って、HLAタイピングはできる限り正確であるべきである。この要求は、主に、腎臓移植および骨髄移植に当てはまる。骨髄移植の場合は、クラスIIHLA抗原のレベルでの完全な同一性が移植成功のための、すなわち、移植片拒絶反応または移植片対宿主病の進行の回避のための決定的な因子を表す。

HLA-D領域に関する遺伝子の発現産物の多型性は、通常は、細胞表面で発現さ

れるHLA遺伝子の産物のアロ抗血清を使用した分析に基づく血清学的技法によって明確にされた。しかし、最良の条件下でさえも、存在する多数の対立遺伝子は、これらの血清学的技法によって検出できない。

HLA DQB1遺伝子座のレベルでの多型性は、DQ w1、2、3および4特異性を定義する血清学的タイピング試薬を使用して検出された(WHO Nomenclature Committee, 1990)。DQ w1特異性は、次いで、血清学的サブタイプDQ w5および6にさらに分類され、DQ w3は、DQ w7、8および9にさらに分類された。しかし、決まって使用される血清型の分類法では、DQ w1、DQ w2、DQ w3の特異性が区別される

に過ぎない。

本発明では、分子生物学を使用することにより、以前考えられていたよりも多くのHLA遺伝子が存在し、特に多くのより異なる対立遺伝子が存在することが分かった。そこで、この多様性を、異なる遺伝子および対立遺伝子のDNA配列のレベルで解析する。HLA-D領域で公知の構造、配列および多型性は、TROWSDALEら、1985, Immunol.Rev.85:5-43に掲げられている。

遺伝子型分析は、クラスII HLA系、特にHLA DQの多様性を遺伝子のレベルで直接分析することを可能にする新規方法である。遺伝子型分析は、分子ハイブリッド形成の原理に基づいており、提案された最初の方法は、制限酵素の使用によるDNAの断片化および得られた断片のサイズの分析で構成されるいわゆる「RFLP」法である。例えば、米国特許第4,582,788号を参照。

RFLP法は、7個のDQ特異性の同定に使用できる。しかし、RFLP分析は、血清学では検出できない或る種の対立遺伝子の相違のみの確認を可能にするものであり、この方法によって提供される可能性は限られている。実際、対立遺伝子は、突然変異が使用される制限酵素の認識部位に位置することを特徴とする場合にのみ同定でき、従って、多くの対立遺伝子はこの分析では確認されない。さらに、RFLP分析は、コード配列における修飾をめったに同定せず、修飾の正確な性質に関する情報を提供するものではない。最後に、この方法は、使用に時間がかかり、困難である。

クラスII HLA遺伝子型を分析するための別の方法が提案されており、いわゆる「オリゴヌクレオチドをベースとするタイピング」法である。これは、クラスII HLA遺伝子、特にDQB遺伝子のDNA配列の知識により、その遺伝子の配列の所与の部位で特異的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドを多型性分析のためのトレーサーとして使用する。これらのオリゴヌクレオチドは、それらの配列の相違に基づいてそれらのハイブリッド形成またはハイブリッド形成の欠如により可能な最大量の情報が得られ、種々の対立遺伝子が同定されるように選択される。たとえそれらが単一のヌクレオチドに影響を及ぼすとしても、配列のいかなる相違も検出が可能であるべきである。

オリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法は、ANGELINIら、Nat. Acad. Sci. USA vol.83: 4489-4493 (1986) の文献に記載されているようにDNAに適用することができ、またRNAにも適用可能である(C. UCLA, J. J. VAN ROOD, J. GORSKI, B. MACH(1987) J. Clin. Invest.80, 1155を参照)。

PCRなどの核酸増幅法は、個々人のクラスII HLAのDNAの分析を容易にした。クラスII HLAのためのオリゴヌクレオチドをベースとするタイピングの最初の適用は、上記で引用した文献にANGELINIらが示しており、標的DNAをナイロン膜に付着させ、標識されたオリゴヌクレオチドプローブによって検出を行ういわゆる「サザン」法を使用している。そのとき、その方法は、通常の血清学では

同定できないクラスII HLA対立遺伝子の検出に適用された(J. M. TIERCY, J. GORSKI, M. JEANNETおよびB. MACH(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 198ならびにJ. M. TIERCY, J. GORSKI, H. BETUEL, A. C. FREIDEL, L. GEBUHRER, M. JEANNETおよびB. MACH(1989) Human Immunol. 24, 1を参照)。クラスII HLAタイピングへの別の直接の適用は、いわゆる「ドットブロット」法を使用した国際特許出願PCT WO 89/11547に記載されたものである。いわゆる「逆ドット」法は、紙またはニトロセルロース膜にヌクレオチドプローブを結合し、標識された標的とのハイブリッド形成の検出を行うことから成るが、これは、HLADQAタイピングおよび地中海性 β -サラセミア突然変異の検出に適用されている(R. K. SAIKIら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol. : 86, p. 6230-6234; (1989))。

細胞のタイピングは、ゲノムの点変異の検出を必要とし、一つのヌクレオチド内の相同配列の検出および相同配列間の区別に十分感受性のあるプローブの開発を伴う。そのために、一般には30ヌクレオチド未満であり、テストに関して高い特異性を与えるが、良好な感受性は保持したままである短いプローブを使用する。短いオリゴヌクレオチドの使用は、広い選択性を持つことを可能にする。

さらに、高い特異性および良好な感受性を示すだけでなく、さらには使用が簡単であり、迅速に行うことができ、安価であり、容易に自動化することができるタイピング方法の開発が望まれている。

本発明は、これらの要件を満たすHLA DQB1タイピングのための方法ならびにプローブおよびキットに関する。

本発明の方法は、cDNA鋳型などの各種起源の異型接合性サンプルをタイピングするのに使用することができ、また、通常の血清学的方法では区別できない対立遺伝子変異体の検出に使用することができる。

本発明のプローブは以下に説明するが、サザン型の方法において検出プローブの形（通例のトレーサーで標識）で使用することができ、あるいは、好ましくは、固体担体上に固定化した捕獲プローブの形（サンドイッチまたは逆ドットロット法）で使用できる。

本発明のタイピング系は、好ましくは、DUNN A.R., HASSEL J.A. (Cell, 12, 23, 1977) で最初に記載されたいわゆる「サンドイッチ」プロトコルを使用する。それは、固体担体に結合し、サンプル中の標的遺伝子に特異的である捕獲プローブという第一のヌクレオチドプローブおよびその標的の別の領域に相補的であり、マーカーによって示すことによりハイブリッド形成の検出を可能にする、第二の標識されたプローブ、いわゆる検出プローブを使用することから成る。本発明の系では、マーカーは例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素であり、他の適する任意のマーカーも使用できる。

本発明の方法は、その長さおよび組成物が、必要とされる特異性および感受性を付与するだけでなく、規定された温度での使用を可能にするように選択されたオリゴヌク

レオチドプローブの選択に基づく。すなわち、本発明のタイピング系は、特に、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の単一温度での操作を可能にするという利点を有する。

しかし、明らかなように、所与の温度で点変異を検出することを意図したプローブの場合ですら、特にハイブリッド形成複合体の安定性を多かれ少なかれ促進する緩衝溶液を使用することによりその長さが或る程度変えられるプローブの使用を意図することが可能である。本発明のプローブは、従って、特に、操作を 37°C 付近であるが、 37°C ではない（実際には、温度検定において誤差を生じることが多い）温度で行うことが望ましい場合、その長さが一般に最大であると考えられる配列によって規定され、さらに、 37°C の温度に最適な配列も示される。

専門家であれば、各特定のオリゴヌクレオチドプローブに対応する相補プローブもちろん、捕獲または検出プローブと同じ役割を果たし得ることは明らかである。本発明は従って、下記に説明するプローブと相補的な配列を有するプローブおよびこれらの相補的配列を使用する方法にまで拡張される。

本発明の主題は、上記した要件を満たすように選択されたヌクレオチド配列を有するプローブである。特に、本発明は、その併用により種々の対立遺伝子間を区別し、必要であれば、今日までに知られている種々のHLA DQ特異性（HLA系因子の命名、1995, Bodmer Julia Gら、TissueAntigens, 1995, 46, 1-18）を同定することすら可能に

する新規プローブに関する。

本発明のヌクレオチドプローブは、特に下記に示すものから選択される（配列は、左から右へ5'端→3'端を示す。）。アルファベット文字は通常の命名によるヌクレオチド（または塩基）を表す。下線部の配列は、本発明に係る好ましい操作条件下での最適配列を表す。従って、プローブは、少なくとも下線部の配列を含み、さらに、下線部以外の塩基から選択される1または2個の別の塩基を含むことができる。すなわち、場合に応じて（もちろん、その配列の連続性は保存して）、5'端に1または2個の別の塩基、あるいは、3'端に1または2個の別の塩基、あるいは、5'端に1個の別の塩基および3'端に1個の別の塩基を含むことができる。ハイブリッド形成および洗浄温度ならびにハイブリッド形

成および／または洗浄緩衝剤の性質などのハイブリッド形成結合強度を変えることを可能にする操作条件に応じて使用されるプローブの長さが調節可能であることは実際、公知である。修飾塩基（例えば、イノシン）のプローブへの導入は、同様の役割を果たすと考えられる。本発明のプローブは、特に、下記配列（各プローブに対して、認識される特異性が示されている）またはそれらの相補配列から選択される。

TG CGT TAT GTG ACC AGA

(26B) : これは、DQB1 06011、06012、0301および0304特異性を認識する；

GTG CGT CTT GTG ACC AGA

(26C) : DQB1 0602、0302および03032特異性；

GT CTT GTA ACC AGA CAC AT

(26D) : DQB1 0603、0604、0607および0608特異性；

CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT

(26F) : DRQB1 06051、06052、0606および0609特異性；

CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT

(26E) : 0201および0202特異性；

GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G

(23A) : DQB1 0401特異性；

G TAC CGG GCA GTG ACG C

(49A) : DQB1 0501特異性；

G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G

(55A) : DRB1 0301、0302、03032、0304および0305特異性；

G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G

(55' A) : DRB1 0301、0302、03032、0304および0305特異性；

G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T

(70A) : DRB1 0602、0603および0608特異性；

G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T

(70' A) : DRB1 0602、0603および0608特異性；

TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C

(70B) : DRB1 0401および0402特異性。

本発明のプローブはまた、下記にそれらのヌクレオチド配列を定義するプローブ23a、23B、26c、26f、37C、37a、45a、57D、57E、57Fおよび70Cでもあり、それらが認識する特異性は、添付の表4に示す。

もちろん、所望ならば、添付する表1および2に示されるように、追加のプローブとして使用される他のプローブによって或る一定の特異性間の区別を行うことができる。

本発明の新規プローブはまた、下記に説明するプローブHRP 1 およびHRP 2 も含む。

上記したオリゴヌクレオチドプローブの配列において、I はイノシンを表す。イノシンは、プローブの判別能を、このプローブがこのプローブを有するサンプル中の試験標的のものと厳密には同一でない核酸配列と形成するハイブリッドをさらに不安定にすることにより高めるために、本発明の或る種のプローブで使用される非天然のヌクレオチドである。

本発明の記載において、23A、26A、26Bなどの後ろに文字が付いた数字または後ろに数字が付いた文字（HRP 1 など）を含む任意の名称は、このように定義し

たプローブ全体（下線部の配列のみを含むもの、およびさらに1または2個の下線部以外の別の塩基を含むもの）を示すが、ただし、下記の実験部分および添付の表においては、これらの名称は下線部の最適配列を有するプローブのみを示す。

本発明の主題はまた、サンプル中に存在する核酸のDQB1タイピングを少なくとも部分的に決定する方法である。該

方法では、公知の方法に従って、サンプル中の該核酸のオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリッド形成の試験を行い、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ に等しい単一の温度でハイブリッド形成が効果的に観察される試験を陽性の試験として選択し、該オリゴヌクレオチドプローブは、下記：

TG CGT TAT GTG ACC AGA (26B),
GTG CGT CTT GTG ACC AGA (26C),
GT CTT GTA ACC AGA CAC AT (26D),
CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT (26F),
CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT (26E),
GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G (23A),
G TAC CGG GCA GTG ACG C (49A),
G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G (55A),
G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T (70A),
TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C (70B),
GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G (23a),
C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG (23B),
GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA (26e),
CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT (26f),
T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C (37C),
C GAG GAI GAC GTG CGC TT (37a),
GC GAC GTG IAI GTG TAC CG (45a),
G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T (57D),
GGG CCG CCT IAC ICC GAG (57E),
GGG CCI CCT GCC GCC GA (57F),
TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G (70C),

またはそれらの相補的配列から成る群から選択される少な

くとも1つのプローブを含み、理解されるように、該プローブは、少なくとも下線部の配列を含み、さらに、配列の連続性は保持しながら下線部以外の塩基から選択される1または2個の塩基を含んでいてもよい。

本発明は特に上記した方法に関し、該方法では、
 -プローブ26D、26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
 -プローブ26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
 -および／またはプローブ57D、57Eおよび57Fの少なくとも一つ、
 -および／またはプローブ23a、23B、26c、37C、37a、45aおよび70Cの少なくとも一つ
 が使用される。

本発明はまた、上記した方法において、さらに、サンプル中の核酸と下記プローブ：

ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG

(26A) ; 認識されるDQB1特異性：0501、0502、05031、05032、0602、0604、0607および0608；

GG CCT GTT GCC GAG TAC T

(57A) ; 認識されるDQBI特異性：0501、0604、06051、0606、0608および0609；

CGG CCT AGC GCC GAG TAC T

(57B) ; 認識されるDQB1特異性：0502および0504；

CGG CCT GAT GCC GAG TAC

(57C) ; 認識されるDQB1特異性：05032、0602、0603および0607；

GC GAC GTG GAG GTG TAC CG

(45A) ; 認識されるDQB1特異性：0301および0304；

A GAG GAG GAC GTG CGC TT

(37A) ; 認識されるDQBI特異性：06011および06012；またはそれらの相補的配列

の少なくとも一つとのハイブリッド形成の試験を行う方法にも関する。

本発明は特に、上記した方法において、3個のプローブ57D、57Eおよび57Fをプローブ57A、57Bおよび57Cの少なくとも一つと組み合わせて使用する方法に関する。

もちろん、陽性であるとして選択される試験はなおも上記した通りである。

本発明の方法において、使用されるハイブリッド形成条件は、明らかなように、標的がプローブのものと完全に相補的である配列を含む場合のみ、各プローブとのハイブリッド形成が選択した単一温度で生じるように予め決められた条件である。これらの条件は、通常の簡単な実験によって決定することができる。標的はもちろん、サンプル中に存在し、個人のHLA DQ遺伝子の多型性領域を含む核酸である。

専門家であれば、本発明方法で利用できる各種プローブが、選択した技術に応じて、標識されたプローブまたは

固体担体への結合を容易にすることを意図したりガンドに結合したプローブ、あるいは、固体担体にすでに結合したプローブのいずれであってもよいことは容易に理解される。特に、プローブは、公知方法に従って、固体担体上に固定してあってもよく、または、固定可能であってもよく、その場合は、捕獲プローブとして使用できる。

特定の態様によれば、ハイブリッド形成試験を、捕獲プローブとして上記したプローブ、すなわち固体担体に結合したプローブを使用して行う。

所与の捕獲プローブとのハイブリッド形成によって固体担体に結合した核酸の可能な存在を示すために、該捕獲プローブによって認識される以外の標的の領域とハイブリッド形成できる標識された検出プローブを使用することができる。特に、下記（下線部は、上述したように、最小配列に相当する。）：

GG ACG GAG CGC GTG CG (HRP1),

C ATC TAT AAC CGA GA (HRP2),

CGC TTC GAC AGC GAC GTG G (HRP3).

から選択される検出プローブを使用することが可能である。

添付した表1を見ると、これらの検出プローブの中でどれが所与の捕獲プローブとともに使用可能であるかを容易に決定することができる。

本発明方法によれば、対立遺伝子の同定は、各々個々のプローブがHLA DQ遺伝子の異なる部分に特異的である一

連のプローブの結合モデルから推定できる。いくつかのプローブを選択することによって、本発明のオリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法は、所望ならば、全てのDQB1対立遺伝子の同定を可能にする。たとえ新しい対立遺伝子が発見されても、これらはクラスII HLA配列の記録に掲載され、これは別のプローブによる特定のプローブの集合の更新を可能とし、従って、その方法を任意の新規対立遺伝子の検出に適応することが可能となる。

完全なクラスII HLAタイピングを合理化するために、まず第一に可能なことは、一定の数のプローブの使用により主なHLA DQB特異性の同定を可能にする第一のDQBタイピング工程を行うことである。

この工程は、多数の臨床用途にとって十分であることが多い。しかし、本発明は、多数のプローブにより、今日までに公知の全てのHLA DQB特異性の認識を可能にするDQBタイピングの第二の工程も許容する。

本発明のオリゴヌクレオチドをベースとするタイピング法によるHLA DQB特異性の分析は、血清学に代わるものとして、通常のDQBタイピングのための組織適合性研究室で使用でき、特に、腎臓移植を待っている名簿にある患者のDQBタイピングまたは可能性のある腎臓ドナーのタイピング、骨髄移植を予定している白血病患者のDQBタイピングおよびその家族または血縁関係のない可能性のあるドナーのタイピング、ボランティアとしての骨髄ドナー名簿作成のための大規模なDQBタイピングを行い、あるいは、

予防医学への適用または実父調査および他の法的確認のための、例えばインシュリン依存性糖尿病の場合の病気とHLA系との関連性を決定することができる。

HLA DQB核酸を含むどの型の組織も本発明方法におけるサンプルとして使用で

きる。また、サンプルに存在する核酸の化学的または酵素的切断などの後に得られた核酸の断片（DNAまたはRNA）を使用することもできる。しかし、実際には、DNAまたはRNAの増幅予備工程を行うべきである。

個々のHLA DQB1タイピング用キットも本発明の主題である。該キットは、次のプローブ：26B、26C、26D、26F、26E、23A、49A、55A、70A、70B、23a、23B、26c、26f、37C、37a、45a、57D、57E、57F、70C、HRP1およびHRP2の少なくとも一つを含み、さらに、26A、57B、57C、37A、45A、57AおよびHRP3から選択される1以上のプローブを含むことができる。

本発明方法および対応するキットにおいて、示したプローブは、もちろん、それらの相補的配列で置き換えることができる。

本発明は特に、次のプローブ（特に捕獲プローブ）：26B、26C、26D、26E、26F、23A、49A、55A、70A、70B、26A、57B、57C、57Aならびに所望によりプローブ45Aおよび37Aの少なくとも一つを含むキットに関する。このキットは、さらに、HRP1、HRP2およびHRP3から選択される1以上の検出プローブを含むことができる。

本発明はまた、下記：

- プローブ26D、26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
- またはプローブ26E、49A、70Aおよび70Bの少なくとも一つ、
- および／またはプローブ57D、57Eおよび57Fの少なくとも一つ、
- および／またはプローブ23a、23B、26c、26f、37C、37a、45aおよび70Cの少なくとも一つ

を含むキットに関する。

本発明は、特に、下記プローブ：

23a、23B、26c、26D、26E、26f、37a、37C、45a、49A、57A、57B、57C、57D、57E、57F、70A、70Bおよび70Cを含むキットに関する。

これらのプローブの使用により集められた情報は、次いで、使用したプローブならびにリストに記載されたHLADQBタイプおよび／または関連のサブタイプの知見を考慮して、確立されたタイピング計画によるタイピングの決定に使用される

。この作業は、タイピング計画、すなわち、タイプおよび／またはサブタイプを認められる陽性反応（ハイブリッド形成）の関数として直接示す表の使用により簡略化される。タイピング計画の例は、添付の表3および5に示す。

本発明で使用するプローブは、適切な条件下でそれらの相補的配列に特異的に結合し得る配列に特異的なオリゴ

ヌクレオチド（OSS）である。ある特定のプローブが唯一のプローブの同定に使用できる場合、そのプローブはOSAと言う。すなわち、一つの対立遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドである。すでに上記したように、一つのプローブでは、特異的なDQB対立遺伝子をそれ自身で同定することができない。

本発明で使用するいくつかの用語の定義を以下に示す。

「遺伝子型」とは、遺伝子の発現産物、特にタンパク質の分析によって示される個々の特徴である「表現型」とは反対の、個々のゲノムの特徴を意味する。

「対立遺伝子」は、同じ遺伝子の別の種々の型を示し、核酸配列のレベルで相違を示す。これらの相違は、DNAのレベル、RNAのレベルおよびそれらのタンパク質への翻訳のレベルで示される。

「多型性」は、同じ遺伝子の異なる対立遺伝子の存在によって一つの集団にもたらされる多様性を特徴とする。

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」は、プライマー、プローブまたは検出しなければならない核酸断片などを示す。オリゴヌクレオチドは、適切な任意の公知方法によって調製できる。

本発明の説明および以下の実験部分では、添付する表1～4を参照する。なお、同じプローブ名（26A、HRP3など）は、下線部の最小配列を示すことによりいくつかのプローブが規定できる配列（上記の説明の場合）のみだけでなく、下線部の最小配列に対応する配列（下記実施例およ

び添付する表1～4の場合）も示し得ることに注意すべきである。

添付の表1には、DQBI^{*} 0501である選択したコンセンサス配列に関して、表2に表したアミノ酸突然変異（一文字コードによって指定）に対応する突然変異の

位置を規定することによるDQB遺伝子の種々の対立遺伝子のDNAの配列が表しである。DNAの突然変異は、非サイレント突然変異、すなわち、その翻訳によりアミノ酸の変化をもたらす突然変異であってもよい。

種々の対立遺伝子のタイピングの場合は、大多数において明らかにそうである、非サイレント突然変異に相当するDNA上の突然変異を使用することが非常に多いが、例えば2個の非常に類似した対立遺伝子間を区別することにより、サイレント型の突然変異を検出することが可能である。

今日までに公知の文献で知られ、発表された全ての対立遺伝子に関するDQB1遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表1および2に示す。

添付する表3は、プローブと認識される特異性との間の対応をまとめたものであり、ある列の四角が黒く塗られている場合、これは、この列で挙げた特異性が、対応の欄のプローブによって認識されることを意味する。

添付の表4は、プローブおよびHLA DQB1特異性の間の対応を再現したものであり、さらに、サイレント突然変異または変異アミノ酸を示す。

下記実施例により本発明を説明する。

実施例1：

固体担体への結合を促進するリガンドに結合した各種プローブを作製した。使用したリガンドは、Aminolink 2 (Applied Biosystems社製、参照番号400808) という市販の化合物である。

リガンドのオリゴヌクレオチドへのカップリングは、下記の一般的プロトコールに従って行われる。

オリゴヌクレオチドを、ホスホルアミダイト化学を使用してApplied Biosystems社製の自動381A装置上で製造者のプロトコールに従って合成する。オリゴヌクレオチドの合成が完了すると、無水アセトニトリルに0.2Mの濃度で溶解したホスホルアミダイトリガンドを合成機の位置Xに置き、標準的な自動合成プロトコールに従ってオリゴヌクレオチドの5'端によりリガンドの付加を行う。

33%水酸化アンモニウム溶液中、55℃で一夜脱保護を行い、次いで-20℃でエタノール沈殿を行った後、修飾オリゴヌクレオチド（リガンドに結合したもの）を

真空下で乾燥し、1 mlの水に吸収させる。

5' 端が修飾されたオリゴヌクレオチドをBrownlee RP18カラム (10mm-25cm)
上での逆相高性能液体クロマトグラフィーにより精製する。

条件：流速4.6 ml/分

勾配10%→35%の緩衝液A、30分；35%→100%の緩衝液B、3分

緩衝液A：0.1モルの酢酸トリエチルアンモニウム(TEAA)、pH7

緩衝液B：50%の緩衝液A + 50%のCH₃CN

実施例2：検出プローブの作製

実施例1と同様に使用し、活性化し、乾燥したオリゴヌクレオチドを200 μ l
の0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH9.3)における 1.25×10^{-7} モル (5mg) のホース
ラディッシュペルオキシダーゼ(Boehringer Mannheim413470)に吸収させる。

精製プロトコールは同じである。コンジュゲートを-20℃で40%のグリセロール
を含むトリス-HCl緩衝液(pH7)に保存する。

実施例3：標的DNAの増幅

増幅は、下記のプライマーを使用してPCRにより行う。

ープライマー1：

5' C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG 3'

ープライマー2：

5' CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC 3'

これらのプライマーは、表1ではDQBAMP-AおよびDQBAMP-Bの名称で示す。

実施例4：

マイクロタイタープレート(Nunc 43454)のウェルに、3xPBS (0.45MのNaCl、0.
15Mのリン酸ナトリウム、pH7) に

おける10~400nMの濃度の所与のDQ特異性の捕獲オリゴヌクレオチド溶液100 μ l
を入れる (1個の捕獲オリゴヌクレオチド/ウェルの割合)。従って、タイピン

グに必要な捕獲プローブと同じほどの多くのウェルを使用する。プレートを37℃で2時間、または室温で15～22時間インキュベートする。

全てのケースにおいて、増幅工程および検出工程をチェックするために陽性の対照を添加する。陽性の対照(C+とする)として使用する捕獲プローブは、今日までに公知の全ての対立遺伝子上に存在する。その配列は次の通りである。

5' GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA 3'

捕獲プローブを陰性の対照(C-とする)として使用する。配列は次の通りである: 5' TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC 3'。プレートを300 μ l のPBSトウイン (0.15MのNaCl、0.05Mのリン酸ナトリウム、pH7; 0.5%トウイン20 (MERCK822184)) で3回洗浄する。増幅産物を室温で5分間、10 μ l の2NのNaOHで変性する。この溶液に、10 μ l の2N酢酸、次いで2.3mlのハイブリッド形成緩衝液 (PEG:0.1Mのリン酸ナトリウム、pH7、0.5MのNaCl、0.65%のトウイン20、0.14mg/mlのサケの精子DNA (Sigma D9156)、PEG 4000 (Merck 807490 2%)) および0.25mlの標識された検出プローブ (オリゴヌクレオチド-ペルオキシダーゼコンジュゲート) を順次添加する。最終溶液を0.1ml/ウェルの割合で各ウェルに分配する。プレートを37℃で60分

間インキュベートする。プレートを300 μ l のPBSトウインで3回洗浄する。オルト-フェニレンジアミン(OPD)基質 (Cambridge Medical Biotechnology 参照番号456) のOPD緩衝液 (0.05Mのクエン酸、0.1MのNa₂HPO₄、pH4.9) における4mg/ml濃度のもの100 μ l を各ウェルに添加し、使用直前に1/1000に希釈した30倍体積の過酸化水素を添加する。20分の反応の後、酵素活性を100 μ l の1N H₂SO₄ でブロックし、492nmで読み取りを行う。

実施例5:

10個のDNAをPCR法に従って増幅する。次いでタイピングを行う。タイピングのプロトコルは、一般には、上記したものに従う。ハイブリッド形成は、サンドイッチ法に従って行う。

タイピングのプロトコルでは、上記した捕獲プローブおよびケースに応じて検出プローブHRP1、HRP2またはHRP3を使用する。

記載した方法は、試験した10個のDNAのタイピングを可能にする。いくつかのタイピング結果を説明として下記に示す。

ケースNo.1:

プローブ	OD x 1000(492nm)
26A	15
49A	12
57B	38
57c	12
37A	12
26B	100
26C	1309
26D	10
26F	18
70A	32
26E	****
55A	316
70B	12
23A	13

は飽和を意味する。

結果：患者はDQB1^{*} 0201または0202/0302または0303である。

ケースNo.2:

プローブ	OD x 1000(492nm)
26A	887
49A	12
57B	459
57c	11
37A	57

26B	80
26C	10
26D	14
26F	10
70A	14
26E	11
55A	11
70B	688
23A	302

結果：患者はDQB1^{*} 0502/0401である。

実施例6：

実施例5に記載の方法と同様の手順を行うが、添付の表5に列挙した捕獲プローブを使用する。

結果を添付の表6にまとめる。

表 1

	1	10	20	30
QDB1*0501	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0502	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0503	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0504	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0505	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0506	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0507	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0508	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0509	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0510	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0511	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0512	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0513	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0514	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0515	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0516	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0517	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0518	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0519	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0520	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0521	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0522	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0523	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0524	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0525	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0526	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0527	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0528	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0529	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0530	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0531	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0532	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0533	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0534	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0535	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0536	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0537	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0538	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0539	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0540	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0541	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG
QDB1*0542	AGA GAC	TTC CAG	CTG TAC	ACG GAG

1

	40	30	20	10	0
DOB1*0301	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0302	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0303	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0304	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0305	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0306	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0307	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0308	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0309	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0310	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0311	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0312	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0313	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0314	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0315	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0316	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0317	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0318	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0319	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0320	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0321	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0322	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0323	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0324	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0325	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0326	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0327	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0328	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0329	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0330	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0331	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0332	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0333	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0334	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0335	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0336	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0337	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0338	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0339	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0340	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0341	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC
DOB1*0342	CCC	GAG	TTC	GAC	GAC

表 2
— 統 葉 —

	50	60	70	80	90	
QCB1*0501	R	57A	G	A	S	V
QCB1*0502	A	P	A	R	A	S
QCB1*0503	V	P	V	A	R	A
QCB1*0504	T	S	S	A	R	A
QCB1*0601		D	D	E	E	E
QCB1*0602		D	D	E	E	E
QCB1*0603		D	D	E	E	E
QCB1*0604		D	D	E	E	E
QCB1*0605		D	D	E	E	E
QCB1*0606		D	D	E	E	E
QCB1*0607		D	D	E	E	E
QCB1*0608		D	D	E	E	E
QCB1*0609		D	D	E	E	E
QCB1*0201		D	D	E	E	E
QCB1*0202		D	D	E	E	E
QCB1*0301		D	D	E	E	E
QCB1*0302		D	D	E	E	E
QCB1*0303		D	D	E	E	E
QCB1*0304		D	D	E	E	E
QCB1*0305		D	D	E	E	E
QCB1*0401		D	D	E	E	E
QCB1*0402		D	D	E	E	E

表 3

[illegible]

表 4

オリゴプローブ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5'→3'	特異性
23A	si21L23	ACC GAG CTC GTG CGG GG	DQB1*0401
23a	si21L23	ACC GAG ITI GTG CGG GG	DQB1*0401
23B	si21R23	AC GGG ACC GAG IGI GTG	DQB1*0305+0402
26A	H30	C AGA CAC ATC TAT AAC	DQB1*0501+0502+05031+05032+0603+0604+0607+0608
26B	si25Y26	CGT TAT GTG ACC AGA	DQB1*06011+06012+0301+0304
26C	si25L26	G CGT CTT GTG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26c	si25L26	G CGT CTT ITG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26D	L26si27	CTT GTA ACC AGA CAC	DQB1*0603+0604+0607+0608
26E	L26S28S30	T CTT GTG AGC AGA AGC	DQB1*0201+0202
26F	si25L26si27Y30	T CTT GTA ACC AGA TAC	DQB1*06051+06052+0606+0609
26f	si25L26si27Y30	T CTT GTA ACC AGI TAC	DQB1*06051+06052+0606+0609
37A	D37	AG GAG GAC GTG CGC	DQB1*06011+06012
37a	D37	AG GAI GAC GTG CGC	DQB1*06011+06012
37C	si35	AC CGA GAA GAG TAC GT	DQB1*0504
43A	E45	GAC GTG GAG GTG TAC	DQB1*0301+0304
45a	E45	GAC GTG IAI GTG TAC	DQB1*0301+0304
49A	A49	AC CGG GCA GTG AC	DQB1*0501
55A	L53P55	CG CCG CTG GGI CCG CTG G	DQB1*0301+0302+03032+0304+0305
57A	V57	CCT GTT GCC GAG TA	DQB1*0501+0604+06051+0606+0608+0609
57B	S57	G CCT AGC GCC GAG TA	DQB1*0502+0504
57C	D57	G CCT GAT GCC GAG T	DQB1*05032+0602+0603+0607
57D	D57	GG IGI CCT IAC GIC GAG TA	DQB1*05031+06011+06012
57E	P55D57	G CCG CCT IAC ICC G	DQB1*0301+0332
57F	P55A57	G CCI CCT GCC GCC	DQB1*0302+0304+0305

表 4

- 例示 -

オリゴプローブ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5'→3'	特異性
70A	T71E74	AG GGI ACC CIG GCI GA	DQB1*0602+0603+0608
70B	T77sI78	G GTG GAC ACC GTA TGC AG	DQB1*0401+0402
70C	G70A71	GAG GGG GCC CGG GCG TC	DQB1*0501+0502+05031+05032
C+	-	GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA	-
C-	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
HRP1	-	ACG GAG CGC GTG	-
HRP2	-	ATC TAT AAC CGA GA	-
HRP3	-	CGC TTC GAC AGC GAC GTG G	-

C+: 陽性の対照

C-: 陰性の対照

sI: サイレント突然変異

変異アミノ酸は一文字コードで示し、後ろにそれらの位置を示す。

表 5

		C	C	7	4	3	5	5	3	7	2	2	5	2	2	5	4	5	2	7	2
		+	-	0	9	7	7	7	0	8	8	7	6	6	7	5	7	3	0	3	
				C	A	C	B	D	a	A	D	f	A	E	c	E	a	F	B	B	
D Q B 1	0501																				
	0502																				
	05031																				
	05032																				
	0504																				
	06011																				
	06012																				
	0602																				
	0603																				
	0604																				
対 立 遣 伝 子	06051																				
	06052																				
	0606																				
	0607																				
	0608																				
	0609																				
	0201																				
	0202																				
	0301																				
	0302																				
	03032																				
	0304																				
	0305																				
	0401																				
	0402																				

表 6

ケースNo.	陽性オリゴプローブ	HLA-DQB タイピング
1	C+, 70C, 57D, 26D, 57A	HLA-DQB1*05031 / 0604
2	C+, 70C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0502 / 0602
3	C+, 57C, 70A, 26D, 57E, 45a	HLA-DQB1*0603 / 0301
4	C+, 70C, 48A, 57A, 23B, 70B	HLA-DQB1*0501 / 0402
5	C+, 57E, 45a, 26c, 57F	HLA-DQB1*0301 / 0302
6	C+, 26c, 26E, 57E	HLA-DQB1*0201 / 03032
7	C+, 26D, 57A, 26f	HLA-DQB1*0604 / 0609
8	C+, 70C, 57B, 45a, 57F	HLA-DQB1*0502 / 0304
9	C+, 57D, 37a, 70B, 23a	HLA-DQB1*0601 / 0401
10	C+, 37C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0504 / 0602

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 97/00980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 11389 A (HOFFMANN LA ROCHE) 9 July 1992 see the whole document	1-24
X	WO 92 10589 A (HOFFMANN LA ROCHE) 25 June 1992 see the whole document	1-24
X	EP 0 459 532 A (CETUS CORP) 4 December 1991 see the whole document	1-24
X	EP 0 472 399 A (MITSUI PETROCHEMICAL IND ;KITASATO INST (JP)) 26 February 1992 see the whole document	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 November 1997		Date of mailing of the international search report 25/11/1997
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Molina Gaian, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. and Application No.

PCT/FR 97/00980

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 08117 A (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 May 1992 see the whole document ---	1-24
X	US 4 965 189 A (OWERBACH DAVID) 23 October 1990 see the whole document ---	1-24
X	WO 89 04875 A (CETUS CORP) 1 June 1989 see the whole document ---	1-24
X	DATABASE GENESEQ Derwent Ac. No. Q34467, May 1993 CARRINGTON: "Distinguishing multiple alleles and identifying new alleles - by single-strand conformation polymorphism technique using specific gel electrophoresis conditions" XP002046163 see sequence & US7751892; 01-12-1992 (US DEP. HEALTH & HUMAN SERVICE) ---	1-24
X	DATABASE GENESEQ derwent Ac. No. Q34463, May 1993 CARRINGTON: "Distinguishing multiple alleles and identifying new alleles - by single-strand conformation polymorphism technique using specific gel electrophoresis conditions" XP002046164 see sequence & US7751892; 01-12-1992 (US DEP. HEALTH & HUMAN SERVICE) -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/00980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9211389 A	09-07-92	AT 150796 T	15-04-97
		AU 656549 B	09-02-95
		AU 9136891 A	22-07-92
		CA 2075052 A	22-06-92
		DE 69125368 D	30-04-97
		DE 69125368 T	09-10-97
		EP 0515660 A	02-12-92
		ES 2101083 T	01-07-97
W0 9210589 A	25-06-92	AU 656161 B	27-01-95
		AU 9136191 A	08-07-92
		CA 2075037 A	07-06-92
		EP 0514534 A	25-11-92
		JP 6505625 T	30-06-94
		US 5567809 A	22-10-96
EP 0459532 A	04-12-91	EP 0459533 A	04-12-91
		AT 125307 T	15-08-95
		AU 594130 B	01-03-90
		AU 6996287 A	17-09-87
		CA 1284931 A	18-06-91
		DE 3751423 D	24-08-95
		DE 3777213 D	16-04-92
		EP 0237362 A	16-09-87
		HK 145894 A	30-12-94
		JP 7313197 A	05-12-95
		JP 62214355 A	21-09-87
		SG 132994 A	13-01-95
		US 5567809 A	22-10-96
		US 5541065 A	30-07-96
		US 5665548 A	09-09-97
		US 5604099 A	18-02-97
		US 5468613 A	21-11-95
		US 5310893 A	10-05-94
EP 0472399 A	26-02-92	CA 2049449 A	21-02-92
		JP 2560160 B	04-12-96
		JP 5276954 A	26-10-93
		JP 8205899 A	13-08-96
		US 5663047 A	02-09-97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/FR 97/00980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9208117 A	14-05-92	NL 9002259 A EP 0553247 A	18-05-92 04-08-93
US 4965189 A	23-10-90	US 5059519 A	22-10-91
WO 8904875 A	01-06-89	AT 106454 T CA 1339098 A DE 3889927 D DE 3889927 T EP 0439458 A US 5665548 A	15-06-94 29-07-97 07-07-94 03-11-94 07-08-91 09-09-97

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACG GAG CGC GTG CG,
- C ATC TAT AAC CGA GA ,
- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G,

1. The following :

And a nucleotide probe which may contain 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part while it is a nucleotide probe chosen from those complementary sequences, this probe has the arrangement of an underline part at least and the continuity of the arrangement is held further.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CGG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
- C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
- GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
- CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
- T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
- C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
- GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
- GGG CCI CCT GCC GCC GA,
- TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

2. Following arrangement :

And the probe according to claim 1 chosen from what is defined by those complementary sequences.

- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,

3. The following : - TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

And the probe according to claim 1 chosen from those complementary sequences.

- G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T,
 - GGG CCG CCT IAC ICC GAG,
4. The following : - GGG CCI CCT GCC GCC GA.

The probe according to claim 1 ** chosen.

- GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G,
 - C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG,
 - GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA,
 - CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT,
 - T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C,
 - C GAG GAI GAC GTG CGC TT,
 - GC GAC GTG IAI GTG TAC CG,
5. The following : - TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G.

The probe according to claim 1 ** chosen.

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
6. Following arrangement : - A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

And the probe according to claim 1 chosen from what is defined by those complementary sequences.

7. Probe of any one statement of claim 1-6 corresponding to arrangement and those complementary sequences of underline part in arrangement.
8. Probe of any one statement of claim 1-7 carrying out coupling to ligand for sign of this probe being carried out, or making those combination to solid support easy, or having combined with solid support.
9. HLA DQB1 of target nucleic acid which exists in sample In a method of determining typing selectively at least, Hybridization by a publicly known method with an oligonucleotide probe of this nucleic acid in a sample is examined, Hybridization chooses an examination effectively observed at a single temperature equal to 37**2 ** as a positive examination, This oligonucleotide probe contains at least one probe chosen from things which claim 2 defined, or those complementary sequences, A method which may contain 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part while this probe holds the continuity of arrangement further including arrangement of an underline part at least.

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
 - GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
 - CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
 - CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
10. The following arrangement :

A method according to claim 9 of examining further hybridization of at least one probe chosen from things defined as alike, or those complementary sequences, and nucleic acid in a sample.

- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,
11. The following arrangement : - A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

A method given in either of claims 9 and 10 which examines further hybridization of at least one

probe chosen from things defined as alike, or those complementary sequences, and a target nucleus in a sample.

12. A method of any one statement of claim 9-11 which uses at least one probe which any one of the claims 3-5 defined.

13. A method of any one statement of claim 9-12 which uses this probe as a capture probe.

14. A method according to claim 13 shown by a detection probe in which a field of a target except a possible existence of nucleic acid combined with a solid support by hybridization with a capture probe being recognized by this capture probe and hybridization are possible, and by which the sign was carried out.

- **GG ACG GAG CGC GTG CG,**

- **C ATC TAT AAC CGA GA ,**

15. A detection probe is the following arrangement. : - **CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.**

A method according to claim 14 chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

16. A method of any one statement of claim 9-15, wherein this probe is similarly defined as claim 7.

17. At least one probe chosen from what is defined by any one of the claims 1-6 is included, and

- **ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,**

- **GG CCT GTT GCC GAG TAC T,**

- **CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,**

- **CGG CCT GAT GCC GAG TAC,**

- **A GAG GAG GAC GTG CGC TT,**

- **GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,**

it is the following arrangement further. : - **CGC TTC GAC AGC GAC GTG G,**

A kit for HLA DQB1 typing which may contain one or more probes chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA ,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,
- G ACG CCG CTG GGG CCG CCT G,

18. The following arrangement :

- G GAG GGG ACC CIG GCI GAG T,
- G GAG GGG ACC CCG GCG GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,

Probes defined as alike or those complementary sequences are included, and it is the following

- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

arrangement further. :

The kit according to claim 17 which may contain one or more probes chosen from things defined as alike, or those complementary sequences.

- TG CGT TAT GTG ACC AGA,
- GTG CGT CTT GTG ACC AGA ,
- GT CTT GTA ACC AGA CAC AT,
- CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT,
- CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT,
- GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G,
- G TAC CGG GCA GTG ACG C,
- G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G,
- G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T,
- TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C,
- ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG,
- CGG CCT AGC GCC GAG TAC T,
- CGG CCT GAT GCC GAG TAC,
- GC GAC GTG GAG GTG TAC CG,

19. The following arrangement :

Or it is the following by a probe and a request which are defined by those complementary

- A GAG GAG GAC GTG CGC TT,

sequences. :

- GG CCT GTT GCC GAG TAC T,

Or the kit according to claim 17 including those complementary sequences.

20. The kit according to claim 17 containing at least one probe of any one statement of claim 3-5.

21. The kit according to claim 20 containing a probe which claim 3, claim 4, and/or claim 5 defined.

22. A kit of any one statement of claim 17-21 which this probe can use as a capture probe.

- GG ACG GAG CGC GTG CG,

- C ATC TAT AAC CGA GA ,

23. It is the following further. : - CGC TTC GAC AGC GAC GTG G.

A kit of any one statement of claim 18-22 containing at least one detection probe which is ** chosen, and by which the sign was carried out.

24. A kit of any one statement of claim 17-23 in which this probe is similarly defined as claim 7.

[Translation done.]

NOTICES *

PO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

. **** shows the word which can not be translated.

. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

Detailed Description of the Invention]

n order to determine HLA DQB1 typing A nucleotide probe and method The theme of this invention i he method, probe, and kit for determining each HLA DQ beta (DQB) genotype.

specially the method, probe, and kit of this invention are related with detection of polymorphis LA DQB1 gene. Although especially this method, these probes, and kit of this invention are pplicable to HLA typing in transplantation, medical diagnosis, and legal medicine, It is thought hat the existence of HLA DQB1 allele is helpful also as an index of susceptibility to the illness f insulin dependent diabetes mellitus etc. of a certain kind.

he code of the HLA (human lymphocyte antigens) system is carried out with a human major istocompatibility complex. It serves as the main restraints in the case of the organ ransplantation between individuals by distinguishing self and not-self. Therefore, the antigen o he HLA system is used in the typing method for determining an individual's genius over the eature and the illness of a certain kind between the donor in the case of an organ ransplantation, and a recipient.

series of loci of polymorphism which an HLA system is analyzed enough and located at intervals f about 2 centimorgans on the short arm of the 6th chromosome from a hereditary viewpoint are omprired to some extent. a group revealed in [three loci (HLA-A, B, and C) of this system] ***** — alloantigen (class I) is encoded. Another field (HLA-D) actually encodes the alloantige class II) of the second group revealed in ***** by advanced polymorphism including some genes. ome of other loci and complementary cascade factors Bf which control especially the ingredient C nd C4 also belong to an HLA system (class III). Most portion depends for a success of an organ ransplantation on the HLA identity (the class I and **II) between a recipient and a donor.

herefore, HLA typing should be exact as much as possible. This demand is mainly applied to a idney transplantation and a bone marrow transplantation. In the case of a bone marrow ransplantation, the decisive factor for the evasion for a transplantation success of the perfect dentity in the level of a class IIHLA antigen (i.e., advance of graft rejection or graft versus ost disease) is expressed.

olymorphism of the gene expression product about a HLA-D field was clarified by the serological echnique based on the analysis which usually uses the ARO antiserum of the product of the HLA ene revealed by cell table **. However, the allele of a large number in which even the bottom of he best condition exists is undetectable by such serological techniques.

he polymorphism in the level of HLA DQB1 locus was detected using the serological typing reagent hich defines DQ w1, 2 and 3, and 4 singularity (WHO Nomenclature Committee, 1990). DQ w1 ingularity ranked second, it was further classified into serological subtype DQ w5 and 6, and DQ 3 was further classified into DQ w7, and 8 and 9. However, the singularity of DQ w1, DQ w2, and Q w3 is only distinguished in the classification of the serotype used by being decided.

n this invention, by using molecular biology showed many HLA genes existed and allele which is specially different from many those existed rather than having thought before. Then, this iversity is analyzed on the level of the DNA sequence of a different gene and allele. A structur ublicly known in a HLA-D field, arrangement, and polymorphism are hung up over TROWSDALE et al., 985, and Immunol. Rev. 85:5-43.

enotypic analysis is a class II HLA system, especially the Norikata Arata method which makes it possible to conduct the direct method of analysis of the diversity of HLA DQ on the level of a gene. Genotypic analysis is based on the principle of molecule hybridization.

The first proposed method is the what is called "RFLP" method. [that comprises fragmentation of DNA by use of a restriction enzyme, and obtained analysis of the size of a fragment] for example, refer to U.S. Pat. No. 4,582,788.

The RFLP method is applicable to identification of seven DQ singularity. However, RFLP analysis enables the check of only a difference of allele of a certain kind undetectable in serology. Possibility of being provided by this method is restricted.

Allele can be identified only when characterized by being located in the recognition site of the restriction enzyme in which mutation is used, therefore many alleles are not actually checked by this analysis. RFLP analysis rarely identifies the ornamentation in a coding sequence, and does not provide the information about the exact character of ornamentation. Finally, this method requires time for use and is difficult.

The option for analyzing class II HLA genotype is proposed, and it is the what is called "type which makes oligonucleotide **SU" method. This is used by the knowledge of the DNA sequence of a class II HLA gene, especially a DQB gene as a tracer for polymorphism analysis of the oligonucleotide which carries out hybridization specifically by the given part of the arrangement of the gene. The information on a possible peak is acquired by lack of those hybridization or hybridization based on a difference of those arrangement, and these oligonucleotides are chosen so that various alleles may be identified. Even if they affect a single nucleotide, any differences of arrangement should be detectable.

The typing method which uses an oligonucleotide as a base, are applicable to DNA as indicated in the literature of ANGELINI et al. and Nat. Acad. Sci. USA vol. 83:4489-4493 (1986). It is applicable also to RNA (C. refer to UCLA, J. J. VAN ROOD, J. GORSKI, and B. MACH (1987) J. Clin. Invest. 80-1155). Nucleic acid amplifying method, such as PCR, made easy analysis of DNA of the individual class II HLA. ANGELINI and others shows application of the beginning of typing which uses the oligonucleotide for the class II HLA as a base to the literature quoted above.

Target DNA is made to adhere to nylon membrane, and the what is called "Southern" method is used. that detects with the oligonucleotide probe by which the sign was carried out]

When the method, The class II which cannot be identified in the usual serology. . Were applied to detection of HLA allele. J. — M. TIERCY, J. GORSKI, M. JEANNET, and B. MACH (1988)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 198 and J. M. TIERCY, J. GORSKI, H. BETUEL, and A. C., [FREIDEL and] L.

Refer to GEBUHRER, M. JEANNET and B. MACH (1989) Human Immunol. 24, and 1. International patent application PCT WO for which another direct application on class II HLA typing used the what is called "dot blot" method It is indicated to 89/11547. What is called a "reverse dot" Although it comprises detecting hybridization with the target by which law combined the nucleotide probe with paper or a nitrocellulose membrane, and the sign was done, This is applied to detection of HLA DQA typing and mediterranean sea nature beta-thalassemia mutation (R. K SAIKI et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol :86, p. 6230- 6234; (1989)).

Typing of a cell needs detection of the point mutation of a genome, and is accompanied by development of the probe which has susceptibility of enough in detection of the homologous array on one nucleotide, and distinction between homologous arrays. Therefore, although it is generally less than 30 nucleotides and high singularity is given about a test, good susceptibility uses the old short probe. Use of a short oligonucleotide makes it possible to have large selectivity. High singularity and good susceptibility are not only shown, but use is still easier, it can carry out promptly, and development of the typing method automatable cheaply and easily is desired. This invention relates to the method, probe, and kit for HLA DQB1 typing which satisfies these requirements.

The method of this invention is applicable to detection of the allelic variation object which can be used for typing the heterozygosity sample of the various origins of a cDNA mold etc., and cannot be distinguished in the usual serological method.

Although the probe of this invention is explained below, in a Southern type method, it can be used

n the form (it is a sign with a usual tracer) of a detection probe, or can be preferably used in the form (sandwiches or reverse dot blotting) of the capture probe fixed on the solid support. The typing system of this invention uses preferably a what is called "sandwiches" protocol first indicated by DUNN A.R. and HASSEL J.A. (Cell, 12, 23, 1977). Combine it with a solid support and a complementary to first nucleotide probe called a capture probe specific to the target gene in sample, and the target's another field. It comprises using the probe which enables detection of hybridization and with which the sign of the second was carried out, and what is called a detection probe by being shown with a marker. In the system of this invention, markers are enzymes, such as horseradish peroxidase, and can use other suitable arbitrary markers. The method of this invention is based on selection of the oligonucleotide probe chosen so that the length and constituent not only give the singularity and susceptibility which are needed, but use at the specified temperature might be enabled. That is, especially the typing system of this invention has the advantage of enabling operation at single 37 °C temperature of 2 °C. However, the length is able to mean use of a certain probe which is changed as for a grade by using the buffer solution which promotes especially the stability of a hybridization complex to some extent even in the case of the probe which meant detecting point mutation at a given temperature so that clearly. The probe of this invention follows, and especially, although it is near 37 °C, operation. When it is desirable to carry out at the temperature which is not 37 °C (a error is actually produced in temperature assay in many cases), it is prescribed by the arrangement considered that the length is generally the maximum, and the still more nearly optimal arrangement for the temperature of 37 °C is also shown. If it is a specialist, it is clear that the complementary probe corresponding to the oligonucleotide probe of each specification can, of course, also play the same role as capture or detection probe. This invention follows and is extended even to the method of using the probe explained below, the probes which have complementary arrangement, and these complementary sequences.

The theme of this invention is a probe which has the nucleotide sequence chosen so that the above mentioned requirements might be satisfied. Especially this invention distinguishes between various alleles according to the concomitant use, and if it is required, it is related with the new probe which even makes it possible to identify various HLA DQ singularity (naming of an HLA system factor, 1995, Bodmer Julia G et al., Tissue Antigens, 1995 and 46, 1-18) known by today. Especially the nucleotide probe of this invention is chosen from what is shown below (arrangement shows 5' end → 3' end from the left to the right.). An alphabetical letter expresses the nucleotide (or base) by the usual naming. The arrangement of an underline part expresses the optimal arrangement under the desirable operating condition concerning this invention. Therefore, the probe can contain at least 1 chosen from bases other than an underline part, or two another bases further including the arrangement of an underline part. That is, according to a case (saving the continuity of the arrangement, of course), 1 or two another bases can be included in 1, two another bases, or 3' end, and one another base can be included in 5' end at one another base and 3' end at 5' end. It is actually publicly known for the length of the probe used according to the operating condition which makes it possible to change hybridization bond strength, such as character of hybridization, washing temperature and hybridization, and/or a washing buffer, to be adjusted. It is thought that the introduction to the probe of a modified base (for example, inosine) plays the same role. Especially the probe of this invention is chosen from the following arrangement (the singularity recognized is shown to each probe), or those complementary arrangement.

TCG CGT TAT GTG ACC AGA

26B): This recognizes DQBI 06011, 06012, and 0301 and 0304 singularity.;

GTG CGT CTT GTG ACC AGA

26C): DQBI 0602, 0302, and 03032 singularity;

3T CTT GTA ACC AGA CAC AT

26D): DQB1 0603, 0604, 0607, and 0608 singularity;

3GT CTT GTA ACC AGA TAC AT

26F): DRQB1 06051, 06052 and 0606, and 0609 singularity;

3GT CTT GTG AGC AGA AGC AT

26E): 0201 and 0202 singularity;

3G ACC GAG CTC GTG CGG GGT G

23A): DQB1 0401 singularity;

3TAC CGG GCA GTG ACG C

49A): DQB1 0501 singularity;

3ACG CCG CTG GGI CCG CCT G

55A): DRB1 0301, 0302, 03032, 0304, and 0305 singularity;

3ACG CCG CTG GGG CCG CCT G

55' A) :DRB1 ₀₃₀₁, 0302, 03032, 0304, and 0305 singularity;

3GAG GGI ACC CIG GCI GAG T

70A): DRB1 0602, 0603, and 0608 singularity;

3GAG GGG ACC CGG GCG GAG T

70' A) :DRB1 0602, 0603, and 0608 singularity;

3CG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C

70B): DRB1 0401 and 0402 singularity.

he probes of this invention are also the probes 23a, 23B, 26c, 26f, 37C, 37a, 45a, 57D, 57E, 57F and 70C which define those nucleotide sequences below again, and the singularity which they recognize is shown in attached Table 4.

f course, if it is a request, as shown in Tables 1 and 2 to attach, other probes used as an additional probe can perform distinction between a certain fixed singularity.

he new probe of this invention also contains again the probes HRP1 and HRP2 explained below.

n the arrangement of the above-mentioned oligonucleotide probe, I expresses inosine.

n order to raise inosine by making still more unstable the hybrid for which this probe forms the distinction ability of a probe with the nucleic acid sequence which is not the same as strictly a he thing of the examination target in the sample which has this probe, It is a nucleotide of non nature used with the probe of this invention of a certain kind.

he arbitrary names containing the characters (HRP1 etc.) in which the number was attached to the umber or the back that the character was attached to back, such as 23A, 26A, and 26B, in the tatement of this invention, Although the whole (thing containing another bases other than a thin ncluding only the arrangement of an underline part and further 1, or two underline parts) probe eefined in this way is shown, in the following experiment portion and an attached table, these ames show only the probe which has the optimal arrangement of an underline part.

he theme of this invention is the method of determining selectively at least DQB1 typing of the ucleic acid which exists in a sample again. In this method, hybridization with the lignonucleotide probe of this nucleic acid in a sample is examined in accordance with a publicly

known method, the examination from which hybridization is effectively observed at a single temperature equal to 37**2 ** is chosen as a positive examination, and this oligonucleotide probe

TG CGT TAT GTG ACC AGA (26B),

GTG CGT CTT GTG ACC AGA (26C),

GT CTT GTA ACC AGA CAC AT (26D),

CGT CTT GTA ACC AGA TAC AT (26F),

CGT CTT GTG AGC AGA AGC AT (26E),

GG ACC GAG CTC GTG CGG GGT G (23A),

G TAC CGG GCA GTG ACG C (49A),

G ACG CCG CTG GGI CCG CCT G (55A),

G GAG GGI ACC CIG GCI GAG T (70A),

TCG GTG GAC ACC GTA TGC AGA C (70B),

GG ACC GAG ITI GTG CGG GGT G (23a),

C AAC GGG ACC GAG IGI GTG CG (23B),

GTG CGT CTT ITG ACC AGA TA (26e),

CGT CTT GTA ACC AGI TAC AT (26f),

T AAC CGA GAA GAG TAC GTG C (37C),

C GAG GAI GAC GTG CGC TT (37a),

GC GAC GTG IAI GTG TAC CG (45a),

G GGG IGI CCT IAC GIC GAG TAC T (57D),

GGG CCG CCT IAC ICC GAG (57E),

GGG CCI CCT GCC GCC GA (57F),

TG GAG GGG GCC CGG GCG TCG G (70C),

s the following. :

r including at least one probe chosen from the group which comprises those complementary sequences, this probe may contain at least 1 or two bases which are chosen from bases other than an underline part further including the arrangement of an underline part, holding the continuity of arrangement so that it may be understood.

specially this invention about the above-mentioned method in this method. - At least one of the probes 26D, 26E, 49A, 70A, and 70B. - At least one of at least one of the probes 26E, 49A, 70A, and 70B, - and/or at least one of the probes 57D, 57E, and 57F, 1, and/or the probes 23a, 23B,

6c, 37C, 37a, 45a, and 70C is used.

n the above-mentioned method, this invention is the nucleic acid and the following probe in a ample further again. : **ACC AGA CAC ATC TAT AAC CG**

26A); DQB1 singularity:0501 recognized, 0502, 05031, 05032, 0602, 0604, 0607 and 0608;
CG CCT GTT GCC GAG TAC T

57A); DQB1 singularity:0501 recognized, 0604, 06051, 0606, 0608 and 0609;
CGG CCT AGC GCC GAG TAC T

57B); DQB1 singularity:0502 and 0504 which are recognized;
CGG CCT GAT GCC GAG TAC

57C); DQB1 singularity:05032 recognized, 0602, 0603 and 0607;
CG GAC GTG GAG GTG TAC CG

45A); DQB1 singularity:0301 and 0304 which are recognized;
A GAG GAG GAC GTG CGC TT

37A); it is related also with the method of examining at least one hybridization of DQB1 singularity:06011 recognized and 06012; or those complementary sequences.

n the above-mentioned method, especially this invention relates to the method of using it ombining three probes [at least one] 57D, 57E, and 57F of the probes 57A, 57B, and 57C. f course, the examination chosen is as having described above still more noting that it is ositive.

n the method of this invention, the hybridization conditions used are conditions beforehand ecided to produce at the single temperature which the hybridization with each probe chose, only hen a target includes the thing of a probe, and completely complementary arrangement so that learly. The easy usual experiment can determine these conditions. It is the nucleic acid which xists in a sample and includes the polymorphism field of an individual HLA DQ gene as well as a arget.

f it is a specialist, the various probes which can be used by this invention method according to he selected art, It is understood easily that they may be any of the probe combined with the igand which meant making easy combination to the probe or solid support by which the sign was arried out, or the probe already combined with the solid support. In particular, in accordance ith the publicly known method, it may fix on the solid support, or fixes, and a probe can be use s a capture probe in that case.

ccording to the specific mode, a hybridization examination is done using the probe above- entioned as a capture probe, i.e., the probe combined with the solid support.

n order to show the possible existence of the nucleic acid combined with the solid support by ybridization with a given capture probe, the field of the target except being recognized by this apture probe and the detection probe which can carry out hybridization and by which the sign was arried out can be used. In particular, it is the following (an underline part is equivalent to he minimum arrangement, as mentioned above.). :

CG ACG GAG CGC GTG CG (HRP1),

ATC TAT AAC CGA GA (HRP2),

CGC TTC GAC AGC GAC GTG G (HRP3).

t is possible to use the detection probe ** chosen.

f attached Table 1 is seen, it can be easily determined in these detection probes in which to be sable with a given capture probe.

According to this invention method, identification of allele can be presumed from the coupled models of a series of probes with each probe respectively specific into the portion from which a LA DQ gene differs. If the typing method which uses the oligonucleotide of this invention as a base by choosing some probes is a request, it will enable identification of all the DQB1 alleles. Even if new allele is discovered, it will become possible for these to be published by record of class II HLA arrangement, and for this to enable renewal of a set of the specific probe by another probe, therefore to be adapted for detection of arbitrary new alleles in the method.

In order to rationalize perfect class II HLA typing, it being possible in the first place is performing the first DQB typing process that enables identification of the main HLA DQB singularity by use of a fixed number of probes first.

For many clinical uses, this process comes out enough and there are many a certain things. However, this invention also permits the second process of DQB typing which enables recognition of all the HLA DQB singularity publicly known by today with many probes.

Analysis of the HLA DQB singularity by the typing method which uses the oligonucleotide of this invention as a base, As what is replaced with serology, it can be used at the histocompatibility laboratory for the usual DQB typing, Typing of a kidney donor with DQB typing of the patient in the list of names which are waiting for the kidney transplantation especially, or possibility, typing of the donor who may not have DQB typing and its family, or relative of the leukemia patient who is planning a bone marrow transplantation, Large-scale DQB typing for the bone marrow donor list-of-names creation as a volunteer can be performed, or the relevance of the illness in or the application to preventive medicine or real father investigation, and other legal checks for example, insulin dependent diabetes mellitus) and an HLA system can be determined.

The organization of every mold containing HLA DQB nucleic acid can use it as a sample in this invention method. The fragment (DNA or RNA) of the nucleic acid obtained after chemical or enzymatic cutting etc. of the nucleic acid which exists in a sample can also be used. However, the amplification preliminary process of DNA or RNA should be performed actually.

Each kit for HLA DQB1 typing is also the theme of this invention. This kit The following probe: 26B, 26C, 26D, 26F, 26E, 23A, 49A, 55A, 70A, 70B, 23a, 23B, 26c, One or more probes chosen from 26A, 57B, 57C, 37A, 45A, 57A, and HRP3 can be further included including at least one of 26F, 70C, 37a, 45a, 57D, 57E, 57F, 70C, HRP1, and the HRP2.

Of course in this invention method and a corresponding kit, the shown probe can be replaced by those complementary sequences.

Especially this invention relates to the kit which contains at least one of the probes 45A and 37. By the following probe (especially capture probe): 26B, 26C, 26D, 26E, 26F, 23A, 49A, 55A, 70A, 70B, 26A, 57B, 57C and 57A, and request. This kit can contain further one or more detection probe chosen from HRP1, HRP2, and HRP3.

Again this invention At least one of the following:—probes 26D, 26E, 49A, 70A, and 70B. — Or at least one of the probes 26E, 49A, 70A, and 70B. — And/or, it is related with the kit containing at least one of at least one of the probes 57D, 57E, and 57F, —, and/or the probes 23a, 23B, 26c, 26f, 37C, 37a, 45a, and 70C.

Especially this invention relates to the kit containing following probe: 23a, and 23B, 26c, 26D, 26E, 26f, 37a, 37C, 45a, 49A, 57A, 57B, 57C, 57D, 57E, 57F, 70A, 70B and 70C.

The information collected by use of these probes is used for the determination of typing by the established typing plan in consideration of the knowledge of the HLA DQB type which ranked second and was written in the probe and list which were used, and/or the subtype of relation. This work is simplified by use of the table directly shown as a function of the positive reaction

(hybridization) which can accept a typing plan, i.e., a type, and/or a subtype. The example of a typing plan is shown in attached Tables 3 and 5.

The probe used by this invention is an oligonucleotide (OSS) specific in the arrangement which can be specifically combined with those complementary sequences under relevant conditions. The probe is called OSA when a certain specific probe can use it for identification of the only probe. That

s, it is an oligonucleotide specific to one allele. As already described above, in one probe, specific DQB allele cannot be identified by itself.

Some definitions of term used by this invention are shown below.

"Genotype" means the feature of each opposite genome as the "phenotype" which is a gene expression product, especially each feature shown by analysis of protein.

"Allele" shows another various molds of the same gene, and shows a difference on the level of a nucleic acid sequence. These differences are shown by the level of DNA, the level of RNA, and the level of translation in those protein.

"Polymorphism" is characterized by the diversity which one group is brought by existence of the allele from which the same gene differs.

The "oligonucleotide" used on these specifications shows a primer, a probe, or the nucleic acid fragment that must be detected. An oligonucleotide can be prepared by the suitable arbitrary publicly known methods.

Tables 1-4 to attach are referred to in explanation of this invention and the following experiments. The same probe names (26A, HRP3, etc.), It should be cautious of the ability of not only the arrangement (when it is the above-mentioned explanation) which can specify some probes but the arrangement (in the case of the following example and Tables 1-4 to attach) corresponding to the minimum arrangement of an underline part to be shown by showing the minimum arrangement of an underline part.

The arrangement of DNA of various alleles of the DQB gene by specifying the position of the mutation corresponding to the amino acid mutation (it specifies in single-character code)

expressed to Table 2 in attached Table 1 about the selected consensus sequence which is DQB1*0501 is expressed. The mutation of DNA may be non-silent mutation, i.e., the mutation which brings about change of amino acid by the translation.

In typing of various alleles, in a large majority with that clearly right. Although the mutation in DNA equivalent to non-silent mutation is used in very many cases, it is possible by distinguishing between two dramatically similar alleles, for example to detect silence type mutation.

It is known for literature publicly known by today, and the nucleotide and amino acid sequence of DQB1 gene about all the announced alleles are shown in Tables 1 and 2.

Table 3 to attach summarizes correspondence between the singularity recognized to be probes, and when the rectangular head of a certain sequence is applied black, it means that the singularity which mentioned this in this sequence is recognized by the probe of the column of correspondence. Attached Table 4 reproduces correspondence between a probe and HLA DQB1 singularity, and shows silent mutation or variation amino acid further.

The following example explains this invention.

Example 1: The various probes combined with the ligand which promotes the combination to a solid support were produced. The used ligand is Aminolink2 (the product made by Applied Biosystems, the reference number 400808).

It is a compound of marketing to say.

Coupling to the oligonucleotide of ligand follows the following general protocol, and is *****.

An oligonucleotide is compounded according to a manufacturer's protocol using phosphor friendly AIT0 chemicals on the automatic 381A device made from Applied Biosystems. If composition of an oligonucleotide is completed, the phosphor friendly DAIT0 ligand dissolved in anhydrous acetonitrile with the concentration of 0.2M will be put on the position X of a synthetic machine, and ligand will be added by 5' end of an oligonucleotide according to a standard automatic composition protocol. Among a 33% ammonium hydroxide solution and after performing deprotection at 55 °C overnight and performing ethanol precipitate at -20 °C subsequently, modified oligonucleotide (what was combined with ligand) is dried under a vacuum, and 1 ml of water is made to absorb.

It is Brownlee RP18 column (10 mm - 25 cm) about the oligonucleotide with which 5' end was embellished.

The upper opposite phase high performance liquid chromatography refines.

onditions: A part for 4.6 ml of rates-of-flow/ 10% of inclination → 35% of buffer solution A, - 30 minutes; 35% of] 100% of buffer solution B. Triethylammonium acetate (TEAA) of A:0.1 mol of -minute buffer solution, The CH₃CN example 2 of A+50% of the buffer solution of B:50% of pH 7
uffer solution: Production of a detection probe It is used like Example 1, It is activated and he horseradish peroxidase (Boehringer Mannheim413470) of the 1.25×10^{-7} mol (5 mg) in the 0.1M odium-borate buffer solution (pH 9.3) of 200microl is made to absorb the dry oligonucleotide. efining protocols are the same. Conjugate is saved at tris-HCl buffer solution (pH 7) which ontains 40% of glycerol at -20 **.

xample 3: Amplification of target DNA PCR performs amplification using the following primer.

Primer 1 : **5' C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG 3'**

Primer 2 : **5' CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC 3'**

able 1 shows these primers under the name of DQBAMP-A and DQBAMP-B.

xample 4: To the well of a microtiter plate (Nunc 43454). Capture oligonucleotide solution 100mu f the given DQ singularity of the concentration of 10 - 400nM in 3xPBS (NaCl of 0.45M, sodium hosphate of 0.15M, pH 7) is put in (one a capture oligonucleotide / well comparatively). herefore, many wells of the same like as a capture probe required for typing are used. A plate i ncubated at 2 hours or a room temperature at 37 ** for 15 to 22 hours.

n all the cases, in order to check an amplification process and a detection process, positive ontrast is added. The capture probe used as positive contrast (it is considered as C+) exists on ll the alleles publicly known by today. The arrangement is as follows.

'GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA3' A capture probe is used as negative contrast (it is considered s C-). :5' TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC3' whose arrangement is as follows. A plate is washed 3 time y PBS Tween (NaCl of 0.15M, sodium phosphate of 0.05M, pH 7; 0.5% Tween 20 (MERCK822184)) of 00microl. Amplification products are denaturalized by NaOH of 2N of 10microl for 5 minutes at a oom temperature. this solution — 2N acetic acid of 10microl — subsequently — 2.3 ml of ybridization buffer solution (sodium phosphate of PEG:0.1M.) NaCl of pH 7 and 0.5M, 0.65% of ween 20, sperm DNA of a 0.14mg/ml salmon (SigmaD9156), PEG 4000 (Merck 807490 2%) and the 0.25-m etection probe by which the sign was carried out (oligonucleotide peroxidase conjugate) equential addition is carried out. A final solution is distributed to each well at a rate of 0.1 l / well. A plate is incubated for 60 minutes at 37 **. A plate is washed 3 times by PBS Tween o 00microl. the OPD buffer solution (the citrate of 0.05M.) of an alt. phenylenediamine (OPD) ubstrate (Cambridge Medical Biotechnology reference number 456) Na₂HPO₄ of 0.1M and 100micro of hings l of the 4mg [/ml] concentration in pH 4.9 are added to each well, and hydrogen peroxide f the 30 time volume diluted to 1/1000 just before use is added. Enzyme activity is blocked by 1 ₂SO₄ of 100microl after the reaction for 20 minutes, and it reads at 492 nm.

xample 5: Ten DNAs are amplified in accordance with the PCR method. Subsequently, it types. enerally the protocol of typing follows the above-mentioned thing. Hybridization is performed in ccordance with a sandwich technique.

n the protocol of typing, detection probe HRP1, HRP2, or HRP3 are used according to the above- entioned capture probe and case.

he indicated method enables typing of ten examined DNAs. Some typing results are considered as xplanation and shown below.

ase No.1 : Probe ODx1000 (492 nm). 26A 15 49A12 57B38 57c12 37A12 26B100 26C1309 26D10 26F 18 0A32 26E **** 55A 316 70B12 23A 13**** means saturation.

esult: A patient is DQB1*0201, 0202/0302, or 0303.

ase No.2 : Probe ODx1000 (492 nm). 26A 887 49A12 57B459. 57c 11 37A5726B80 26C10 26D14 26F 10 0A14 26E11 55A11 70B688 23A 302 result: Patients are DQB1*0502/0401.

xample 6: Although the same procedure as the method of a statement is followed in the Example 5, he capture probe enumerated to attached Table 5 is used.

result is summarized in attached Table 6.

DQBAMP-A										HRP1										HRP2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
DQB1*0501	DQB1*0502	DQB1*05031	DQB1*05032	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1*0504	DQB1*05011	DQB1*05012	DQB1*0502	DQB1*0503	DQB1

統
集

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran_web_cgi_ejje?atw_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.inpit.go.jp%2F... 6/1/200

DQ8AMP-B

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/cgi-bin/tran_web_cgi_ejje?atw_u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.inpit.go.jp%2F... 6/1/200

表 2

1	R	O	S	P	E	D	F	Y	Q	F	K	G	L	C	Y	F	T	N	G	T	E	R	V	R	G	V	T	R	H	I	Y	N	R	E	E	Y	V	R	F	D	S	D	V	G	V	Y			
DOB1'0501																																																	
DOB1'0502																																																	
DOB1'0503																																																	
DOB1'0504																																																	
DOB1'0505																																																	
DOB1'0506																																																	
DOB1'0507																																																	
DOB1'0508																																																	
DOB1'0509																																																	
DOB1'0510																																																	
DOB1'0511																																																	
DOB1'0512																																																	
DOB1'0513																																																	
DOB1'0514																																																	
DOB1'0515																																																	
DOB1'0516																																																	
DOB1'0517																																																	
DOB1'0518																																																	
DOB1'0519																																																	
DOB1'0520																																																	
DOB1'0521																																																	
DOB1'0522																																																	
DOB1'0523																																																	
DOB1'0524																																																	
DOB1'0525																																																	
DOB1'0526																																																	
DOB1'0527																																																	
DOB1'0528																																																	
DOB1'0529																																																	
DOB1'0530																																																	
DOB1'0531																																																	
DOB1'0532																																																	
DOB1'0533																																																	
DOB1'0534																																																	
DOB1'0535																																																	
DOB1'0536																																																	
DOB1'0537																																																	
DOB1'0538																																																	
DOB1'0539																																																	
DOB1'0540																																																	
DOB1'0541																																																	
DOB1'0542																																																	

[illegible]

表 3

	2	2	2	2	2	2	2	3	4	4	5	5	5	5	7	7
	3	6	6	6	6	6	6	7	5	9	5	7	7	7	0	0
	A	A	B	C	D	E	F	A	A	A	A	A	B	C	A	B
XQB1*0501																
XQB1*0502																
XQB1*05031																
XQB1*05032																
XQB1*0504																
XQB1*06011																
XQB1*06012																
XQB1*0602																
XQB1*0603																
XQB1*0604																
XQB1*06051																
XQB1*06052																
XQB1*0606																
XQB1*0607																
XQB1*0608																
XQB1*0609																
XQB1*0201																
XQB1*0202																
XQB1*0301																
XQB1*0302																
XQB1*03032																
XQB1*0304																
XQB1*0305																
XQB1*0401																
XQB1*0402																

オリゴプローブ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5'→3'	特異性
23A	si21L23	ACC GAG CTC GTG CGG GG	DQB1*0401
23a	si21L23	ACC GAG ITT GTG CGG GG	DQB1*0401
23B	si21R23	AC GGG ACC GAG IGI GTG	DQB1*0305+0402
26A	H30	C AGA CAC ATC TAT AAC	DQB1*0501+0502+05031+05032+0603+0604+0607+0608
26B	si25Y26	CGT TAT GTG ACC AGA	DQB1*06011+06012+0301+0304
26C	si25L26	G CGT CTT GTG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26c	si25L26	G CGT CTT ITG ACC AGA	DQB1*0602+0302+03032
26D	L26si27	CTT GTA ACC AGA CAC	DQB1*0603+0604+0607+0608
26E	L26S28S30	T CTT GTG AGC AGA AGC	DQB1*0201+0202
26F	si25L26si27Y30	T CTT GTA ACC AGA TAC	DQB1*06051+06052+0606+0609
26f	si25L26si27Y30	T CTT GTA ACC AGI TAC	DQB1*06051+06052+0606+0609
37A	D37	AG GAG GAC GTG CGC	DQB1*06011+06012
37a	D37	AG GAI GAC GTG CGC	DQB1*06011+06012
37C	si35	AC CGA GAA GAG TAC GT	DQB1*0504
45A	E45	GAC GTG GAG GTG TAC	DQB1*0301+0304
45a	E45	GAC GTG IAI GTG TAC	DQB1*0301+0304
49A	A49	AC CGG GCA GTG AC	DQB1*0501
55A	L53P55	CG CCG CTG GGI CCG CTG G	DQB1*0301+0302+03032+0304+0305
57A	V57	CCT GTT GCC GAG TA	DQB1*0501+0604+06051+0606+0608+0609
57B	S57	G CCT AGC GCC GAG TA	DQB1*0502+0504
57C	D57	G CCT GAT GCC GAG T	DQB1*05032+0602+0603+0607
57D	D57	GG IGI CCT IAC GIC GAG TA	DQB1*05031+06011+06012
57E	P55D57	G CCG CCT IAC ICC G	DQB1*0301+0332
57F	P55A57	G CCI CCT GCC GCC	DQB1*0302+0304+0305

- 結果 -

オリゴプロープ	変異アミノ酸	ヌクレオチド配列 5'→3'	特異性
70A	T71E74	AG GGI ACC CIG GCI GA	DQB1*0602+0603+0608
70B	T77sI78	G GTG GAC ACC GTA TGC AG	DQB1*0401+0402
70C	G70A71	GAG GGG GCC CGG GCG TC	DQB1*0501+0502+05031+05032
C+	-	GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GA	-
C-	-	TAT GAA ACT TAT GGG GAT AC	-
HRP1	-	ACG GAG CGC GTG	-
HRP2	-	ATC TAT AAC CGA GA	-
HRP3	-	CGC TTC GAC AGC GAC GTG G	-

C+: 陽性の対照 C-: 陰性の対照 sil: サイレント突然変異

変異アミノ酸は一文字コードで示し、後ろにそれらの位置を示す。

表 5

		C	C	7	4	3	5	5	5	3	7	2	2	5	2	2	5	4	5	2	7	2	
		+	-	0	9	7	7	7	7	0	6	6	7	6	6	7	5	7	3	0	3		
				C	A	C	B	D	C	a	A	D	f	A	E	c	E	a	F	B	B	a	
D Q B 1 对 立 遣 伝 子	0501																						
	0502																						
	05031																						
	05032																						
	0504																						
	06011																						
	06012																						
	0602																						
	0603																						
	0604																						
	06051																						
	06052																						
	0606																						
	0607																						
	0608																						
	0609																						
	0201																						
	0202																						
	0301																						
	0302																						
	03032																						
	0304																						
0305																							
0401																							
0402																							

表 6

ケースNo.	陽性オリゴプローブ	HLA-DQB タイピング
1	C+, 70C, 57D, 26D, 57A	HLA-DQB1*05031 / 0604
2	C+, 70C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0502 / 0602
3	C+, 57C, 70A, 26D, 57E, 45a	HLA-DQB1*0603 / 0301
4	C+, 70C, 49A, 57A, 23B, 70B	HLA-DQB1*0501 / 0402
5	C+, 57E, 45a, 26c, 57F	HLA-DQB1*0301 / 0302
6	C+, 26c, 26E, 57E	HLA-DQB1*0201 / 03032
7	C+, 26D, 57A, 26f	HLA-DQB1*0604 / 0609
8	C+, 70C, 57B, 45a, 57F	HLA-DQB1*0502 / 0304
9	C+, 57D, 37a, 70B, 23a	HLA-DQB1*0601 / 0401
10	C+, 37C, 57B, 57C, 70A, 26c	HLA-DQB1*0504 / 0602